

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-507348
(P2003-507348A)

(43) 公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
35/76		35/76	4 C 0 7 6
47/30		47/30	4 C 0 8 4
47/34		47/34	4 C 0 8 7
47/42		47/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-516578(P2001-516578)
(86) (22) 出願日 平成12年8月18日 (2000.8.18)
(85) 翻訳文提出日 平成14年2月15日 (2002.2.15)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 2 6 1 9
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 1 2 2 3 5
(87) 国際公開日 平成13年2月22日 (2001.2.22)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 3 7 7 , 1 5 3
(32) 優先日 平成11年8月19日 (1999.8.19)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
90007 ロサンゼルス ユニバーシティ
パーク サウス ホープ ストリート
3716 スート 313
(72) 発明者 ローゼンバーグ, ヤニーナ
アメリカ合衆国, 91604 カリフォルニア,
ステューディオ シティ, ドナ ドローレス
プレイス 11473
(74) 代理人 弁理士 丹羽 宏之

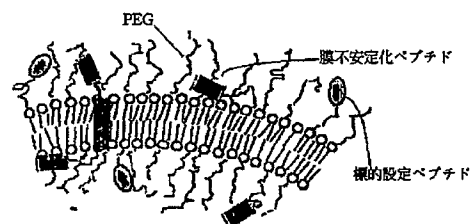
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的設定人工遺伝子送達

(57) 【要約】

遺伝子治療に対する新規で改良された組成物と方法が提供される。とりわけ標的設定人工遺伝子送達 (TAGD) ベクターが提供され、それは遺伝子送達のための組換えウイルス粒子 (ヌクレオカプシド) または組換えコアを取り囲む多機能人工表面成分より成る。

標的人工遺伝子送達 (TAGD) 表面エンジニアリング



【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的細胞への核酸の細胞特異的送達のための一つの非天然発生ウイルス遺伝子治療ベクターであって、組換えウイルスコア、非天然発生機能表面部分、および前記コアを前記機能表面部分と会合させるリンカーより成り、

ここで前記コアは核酸分子より成り、

ここで前記ベクターは少なくとも1個の治療核酸、ペプチド、またはタンパク質の産生を促進し、

ここで前記機能表面部分は免疫防御エレメント、標的設定エレメントおよび細胞侵入エレメントより成るグループから選択される少なくとも1個の機能エレメントより成り、また

ここで前記リンカーは多価ポリマーおよびポリマー修飾脂質より成るグループから選択される少なくとも1個のエレメントより成り、また

これにより前記ベクターは、前記コアに結合しそれを標的細胞に送達する、ことを特徴とするベクター。

【請求項2】 請求項1記載のベクターであって、ここで前記コアが更に少なくとも1個のウイルスカプシドタンパク質より成ることを特徴とするベクター。

【請求項3】 請求項1記載のベクターであって、ここで前記機能表面部分が免疫防御エレメントより成ることを特徴とするベクター。

【請求項4】 請求項1記載のベクターであって、ここで前記機能表面部分が標的設定エレメントより成ることを特徴とするベクター。

【請求項5】 請求項1記載のベクターであって、ここで前記機能表面部分が細胞侵入エレメントであることを特徴とするベクター。

【請求項6】 請求項1記載のベクターであって、ここで前記機能表面部分が免疫防御エレメント、標的設定エレメント、および細胞侵入エレメントより成ることを特徴とするベクター。

【請求項7】 請求項3記載のベクターであって、ここで前記免疫防御エレメントが合成ポリマー部分であることを特徴とするベクター。

【請求項8】 請求項4記載のベクターであって、ここで標的設定部分が正

常細胞よりも罹患細胞でより高度に発現される受容体と結合することを特徴とするベクター。

【請求項9】 請求項8記載のベクターであって、ここで前記標的設定部分が細胞表面受容体のためのペプチドまたはペプチド擬態リガンドであることを特徴とするベクター。

【請求項10】 請求項5記載のベクターであって、ここで前記細胞侵入エレメントが膜不安定化部分であることを特徴とするベクター。

【請求項11】 請求項10記載のベクターであって、ここで前記膜不安定化部分が両親媒体 α ラセンより成ることを特徴とするベクター。

【請求項12】 請求項10記載のベクターであって、ここで前記膜不安定化部分がグルタミン酸とロイシンのコポリマーより成ることを特徴とするベクター。

【請求項13】 請求項11記載のベクターであって、ここで前記両親媒性 α ラセンがウイルスenvタンパク質のC末端ドメインから誘導されることを特徴とするベクター。

【請求項14】 請求項11記載のベクターであって、ここでC末端ドメインがモロニー白血病ウイルスenvタンパク質のC末端ドメインであることを特徴とするベクター。

【請求項15】 請求項14記載のベクターであって、ここで前記C末端ドメインがモロニー白血病ウイルスenvタンパク質のアミノ酸598-616より成ることを特徴とするベクター。

【請求項16】 請求項7記載のベクターであって、ここで前記合成ポリマー成分がポリ（エチレングリコール）より成ることを特徴とするベクター。

【請求項17】 請求項7記載のベクターであって、ここで前記合成ポリマーがグルタミン酸とロイシンより成ることを特徴とするベクター。

【請求項18】 患者にある疾病を処置する方法であって、前記患者に請求項1記載の治療有効量を投与することより成ることを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項1記載の遺伝子治療ベクターであって、ここで前記リンカーが多価ポリマーより成ることを特徴とする遺伝子治療ベクター。

【請求項20】 請求項19記載の遺伝子治療ベクターであって、ここで前記多価ポリマーがグルタミン酸とロイシンアミノ酸を不可欠に構成されることを特徴とする遺伝子治療ベクター。

【請求項21】 請求項1記載の遺伝子治療ベクターであって、ここで前記リンカーがポリマー修飾脂質を含むことを特徴とする遺伝子治療ベクター。

【請求項22】 請求項21記載の遺伝子治療ベクターであって、ここで前記ポリマー修飾脂質の近位端部が疎水性または両親媒性部分で修飾されることを特徴とする遺伝子治療ベクター。

【請求項23】 請求項21記載の遺伝子治療ベクターであって、ここで前記ポリマー修飾脂質の遠位端部がリガンドまたは標的設定部分で修飾されることを特徴とする遺伝子治療ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

1. 発明の属する技術分野

本発明は標的細胞への細胞特異的遺伝子送達のための改良されたベクターを提供する。本発明に基づくベクターは送達される遺伝物質を含む組換えコアと、コアを包含する人工的に再構築された表面より成る。この表面はベクターの標的設定と細胞融合を促進し、またベクターに免疫防御機能を提供する。ベクターを調製する方法およびベクターを用いる真核細胞を形質移入する方法も同じく開示される。

【0002】

2. 背景技術の説明

遺伝子治療は、希有な相続遺伝子欠損から癌、エイズ、高血圧、アテロームおよび糖尿病などの一般の疾病までに及ぶ多くのヒトの疾病に有効な処置を提供するその潜在能力に対して多大の関心を引きつけた。遺伝子治療の大きな可能性は、これまでの所、遺伝子構築物を生体内および生体外で細胞に送達するための有効なベクターシステムの欠除によりこれまで妨げられてきた。

【0003】

従来薬剤での標的送達については、遺伝子治療の目標の一つは、遺伝子送達の局所治療効果を最大にし、一方全身の逆事象の可能性を最少にすることである。この目標を達成するために、理想的な遺伝子送達ベクターはいくつかの属性を持たねば成らない。まず第1にベクターは生体内で標的部位に到達できるのもでなければならず、望ましくは特異的な細胞型を認識できねばならない。これはベクターが特性を標的設定するのと同じく低い免疫原性を持つことを必要とする。第2に、ベクターは、その治療遺伝物質を細胞内部に送達するために宿主細胞の膜障壁を交差することができなければならない。現在のベクターシステムの能力は、大抵の場合は大き過ぎて望ましい遺伝子構築物の送達に順応することができない。第3に、細胞内で一度ベクターは有効な遺伝子発現を行えるようにその遺伝荷重を降ろすことができなければならない。その発現は望ましくは細胞特異的

であり、全体として無害である。殆どの適用でベクターはそれ自身のDNAを自動的に複製する能力を欠いていなければならない。第4に、必要であればベクターは延長された時間にわたり制御され持続する遺伝子発現を提供しなければならない。第5として、ベクターは商業的規模で製造が容易にできねばならず、また薬理的に送達できる濃縮形態で利用できねばならない。

【0004】

遺伝子治療で現在利用できる送達システムは、これらすべての属性に関して満足なものは何もない。従って遺伝子治療の進歩は、新しく改良された遺伝子ベクターシステムの発展に重く依存している。

【0005】

現在生体内治療用遺伝子でもっとも普通に使用されている方法は、ウイルス送達システムと陽イオンポリマーシステムまたは脂質ベイストシステムである。ウイルスベイストシステムでは、ウイルスの天然細胞浸透能力が治療用遺伝子を送達するように操作された遺伝子修飾ウイルスで保持される。ポリマーまたは脂質ベイストシステムでは、治療用DNAが1個またはそれ以上の陽イオンポリマーおよびまたは陽イオン脂質で濃縮され、細胞送達が負に電荷された細胞と正に電荷された遺伝子送達粒子の間の吸引を利用する。現在の適用方法の殆どでは、特異的細胞型の標的設定は達成されてはいない。

【0006】

クラスとしてのウイルスベクターはいくつかの著しい欠点、例えば宿主免疫系から有効に逃れられないこと、感染できる細胞の型での制約、高力価のベクターを産生することの困難性、大型DNAまたはRNA分子をパッケージする能力での制約、および宿主ゲノムへの組込みなどに苦勞しており、この組込みは安定した発現には有利であるが、それでも限定された低いものではあるけれども機能的ゲノム部位への望ましくない挿入の機会を産生する。ポリマーまたは脂質などの作用薬への被包された核酸を用いる遺伝子導入は広い範囲での試験管内宿主細胞を形質移入する能力をもつが、それはまた免疫系を逃れることのできないということ、細胞特異性の欠失、侵入メカニズムの欠除による細胞侵入の低能率、また細胞内で一度ベクターのアンパッキングが行われるとその低能率などの生体

送達での問題に悩むことになる。

【0007】

ウイルスおよび非ウイルスエレメントの組合せを、細胞への遺伝子導入の効率を高めるために使用することができる。例えばファスベンダー他（ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、272巻：6479-6489ページ（1997年））は、被包DNAの送達効率を高めるためにアデノウイルスリボソーム分解回避機能の人工パッケージDNA処方への取り込みを記載した。ウイルス及び非ウイルスエレメントの組合せの一つの例は、陽イオンリボソームを複合化されたアデノ関連性ウイルス（AAV）の逆方向末端反復（ITR）配列を含むプラスミドを使用し、ここで遺伝子導入と続くインターロイキン-2遺伝子発現は、ITRsの欠除で得られた水準よりも3-10倍高かった。フィーヴェーク他、キャンサー・リサーチ、55巻2366-2372ページ（1995年）を参照されたい。も一つの例においては、アデノウイルスカプシドタンパク質またはアデノウイルス線維タンパク質がリボソームと組合わされ、レポーター遺伝子の増加した遺伝子導入効率を提供する。ホン他、チャイニーズ・メディカル・ジャーナル、108巻、332-337ページ（1995）。

【0008】

最近のこれらの発展にも拘らず、低い免疫原性、増大したベクターの安定性、十分な標的設定の多様性、および増加した遺伝子発現効率を同時に提供することを満足させる標的設定遺伝子送達のための現在利用可能な方法はない。従って、本発明の目標は、従来の技術におけるこれらの困難に打ち勝ち、標的設定遺伝子送達および発現のための多様なベクターを提供することにある。

【0009】

【発明の概要】

従って本発明の目的は、核酸の標的細胞への細胞特異的送達のための改良された非天然発生遺伝子治療ベクターを提供することである。

【0010】

更に、本発明の目的は、患者にこのようなベクターの治療に有効量を投与することにより、患者の疾病を処置する方法を提供することである。

【0011】

これらおよび他の目的を達成するために、本発明の一つの見地に従って、組換えおよび非天然発生機能表面成分より成る非天然発生遺伝子治療ベクターが提供され、ここで前記コアは核酸分子より成り、またベクターの少なくとも1個の発現産物は治療用核酸、ペプチドまたはタンパク質であり、ここで機能表面成分は免疫防御エレメント、標的設定エレメント、および細胞侵入エレメントより成るグループから選択された少なくとも1個の機能エレメントを含み、またここでベクターはコアを標的細胞に特異的に結合し、またコアを細胞に送達できるものである。

【0012】

本発明の一実施例に従って、コアは更に少なくとも1個のウイルスカプシドタンパク質を含む。も一つの実施例では、機能表面成分は免疫防御エレメントを含む。更にも一つの実施例では、機能表面成分は標的設定エレメントを含む。更にまたも一つの実施例では、機能表面成分は、細胞侵入エレメントを含む。更なる実施例では、機能表面成分は免疫防御エレメント、標的設定エレメント、および細胞侵入エレメントを含む。

【0013】

本発明の一つの見地に従って、免疫防御エレメントは合成ポリマー成分である。この合成ポリマー成分はポリ（エチレングリコール）を含む。合成ポリマー成分は更にグルタミン酸とロイシンのコポリマーを含む。

【0014】

本発明のも一つの見地に従って、標的設定成分は、正常細胞よりも疾病細胞でより高度に発現されるレポーターと結合する。標的設定成分は、ペプチドまたは細胞表面レセプターのペプチド擬態リガンドである。

【0015】

本発明の更にも一つの見地において、細胞侵入エレメントは膜不安定化成分である。膜不安定化成分は両親媒性 α ラセンを含む。両親媒性 α ラセンはウイルスenvタンパク質のC末端ドメインから誘導される。特定の実施例において、C末端ドメインはモロニー白血病タンパク質envタンパク質のC末端ドメインで

ある。このC末端ドメインはモロニー白血病ウイルスenvタンパク質のアミノ酸598-616を含む。も一つの実施例では、膜不安定化成分はグルタミン酸とロイシンのコポリマーを含む。

【0016】

本発明の他の目的、特性および利点は以下で述べる詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし詳細な説明および特異的な実施例は一方で本発明の望ましい実施例を示しているが単に説明のみにより与えられており、何故ならば本発明の性質と範囲内で各種の変化と修飾がこの詳細な説明から発明の属する技術の分野で通常の知識を有するものにとって明らかとなるであろう、ということは理解されねばならない。

【0017】

【望ましい実施例の詳細な説明】

本発明は遺伝子治療のための新規に改良された組成物と方法を提供する。とりわけ標的人工遺伝子送達（「TAGD」）ベクターが提供され、これは組換えウイルス粒子（ヌクレオカプシド）または組換えコアを取り巻く多機能人工表面成分より成る。

【0018】

機能表面は分子状エレメントを含み、これはベクターに宿主の免疫系を回避し、特異的標的細胞を認識してそれと結合し、また標的細胞と効果的に結合しコア遺伝子によりコード化された導入遺伝子を標的に送達することを可能にする。表面分子エレメントは例えば多重ペプチドおよび免疫防御エレメントを含むことができる。本発明は更に新規な組成物と方法を使用して遺伝子疾病を処置するための方法を提供する。

【0019】

一つの実施例においては、本発明は組換えウイルスの現存する脂質被包成分がウイルス粒子の望ましい特性を高めまた提供するベクターを提供する。例えば、ウイルス表面は免疫防御エレメント、例えばポリ（エチレングリコール）などのポリマーグループを加えるように操作することができ、これはウイルス粒子の免疫原性を減少し、更に血液循環でのベクターの安定性を増加させる。このウイル

ス表面は更にウイルスの細胞特異性を高める標的設定リガンドの追加により修飾することができる。例えば以下により詳細に記載する方法を用いて、この表面は標的細胞の表面で好みのレセプターと特異的に相互作用することのできるリガンド分子を含むように遺伝子操作することができる。

【0020】

も一つの実施例では、この表面はベクターの細胞侵入性を高めるエレメントを含むように修飾される。とりわけ融合誘導ペプチド、タンパク質またはポリマーが標的細胞へのベクターの侵入を高めるために使用される。融合誘導成分はウイルスコアの細胞質への侵入を促進し標的細胞の細胞膜へのベクターの融合を促進する。融合誘導成分はウイルス融合誘導ペプチドなどのような天然発生融合誘導因子であり、あるいは膜不安定性を提供する膜活性両親媒性 α ラセンまたは他の配座特性を含むペプチドなどのような遺伝子操作（非天然発生）成分であることもある。選択肢として、融合誘導成分は膜不安定性を提供するポリマーであることもできる。

【0021】

これら実施例のそれぞれにおいて、遺伝子送達粒子の現存する表面に対する修飾は、非共有結合で作られており、ここでは機能成分を含むように化学接合で修飾された脂質は粒子を含むコアの表面に取り込まれている。この取り込みは、例えば望ましい修飾成分を含むミセル形式により行われ、ここでミセルは従来公知の方法を用いて粒子の表面に自発的に融合される。非共有結合修飾は更に静電相互作用およびまたは疎水性（ファンデルワールス）相互作用による粒子表面への機能成分の吸着により行うことができる。

【0022】

選択肢として、修飾は遺伝子送達粒子の表面成分の共有結合修飾により行うことができる。かくして例えば、被包ウイルスの場合では、ウイルス表面の膜脂質は続く修飾グループの共有付着ができるように化学的活性化リンカーに連結することができる。膜糖タンパク質上の炭水化物グループは反応性アルデヒド基を生産する従来技術で公知の方法を用いて化学的酸化することができ、それは例えば遊離アミノ基を含むポリマー物質またはペプチドでの共有結合修飾を可能にす

る。膜構成物質の共有結合修飾についての他の方法は十分に従来の技術で公知である。

【0023】

も一つの実施例では、現存するウイルス表面は活性化結合物での反応により脂質およびまたはタンパク質化合物で化学的に修飾され得る。活性化リンカー化合物は、必ずしもそれに限定されないが、高度に反応性の化学基の取り込み、例えばハロゲン化スルホニルおよびまたはアミノ基修飾のためのカルボン酸の各種活性エステル、炭水化物修飾のためのヒドラジド、チオール基修飾のためのマレイミドイルまたは反応性アルキルハロゲン化合物、および従来の技術で既知の光活性化基を含む。当業者は他の化学活性化基の使用も本発明の範囲内にあることを知るであろう。

【0024】

も一つの選択肢として、遺伝子送達粒子の表面にある官能基が反応性およびまたは化学的に選択できる基を生産するための従来公知の技術を使用して化学的に修飾でき、これは例えば遊離アミノ基を含むポリマー物質またはペプチドでの共有結合修飾を可能にする。一つの特異的な実施例は2-イミノチオレイン（トラウト試薬）でのウイルス表面の修飾であり、これはウイルス表面のアクセス可能なアミノ基をスルフヒドリル基（メルカプト基）に転換する。これは接合のチオール選択的方法を使用することで修飾の選択性を高めることを可能にする。トラウト試薬でのウイルス表面の修飾は更に各種ウイルスの化学的修飾の最適効率水準を推定する非常に便利な手段を提供する。もし化学的修飾があまりにも低ければ、ウイルス表面の性質は望まれるように変化せず、一方あまりにも高い修飾の水準はウイルスを不活性化するであろう。本発明者は、たとえ不安定なモロニー白血病ウイルスでもウイルス力価の機能的に著しい損失なしで著しく高い化学物質の負荷を可能にするであろう。ウイルス力価の測定方法、続いて化学的修飾の方法は、従来の技術で公知である。

【0025】

も一つの実施例では、PEGまたは標的設定あるいは融合誘導ペプチドなどのベクターに導入される機能グループはまず活性化リンカーと接合される。このリ

ンカーは望ましくは遺伝子送達粒子の表面により優れた親和性を持つ疎水性遺伝子座を持つ。例えばグルタミン酸とロイシンのコポリマーが（以下でより詳細に説明されるが）使用される。リンカーはまた細胞表面へのより優れた親和性のために正の電荷を運ぶ。活性グループのある部分は粒子の表面へのリンカーの共有結合付着のために保持（あるいは新規に創出）することができる。例えばこのリンカーは、壊れやすいウイルスを過大な化学的処置にさらすことなしに多くの方法でウイルス表面を修飾するために使用することができる。図1は免疫防御エレメント（PEG）、融合誘導エレメント（膜不安定ペプチド）および細胞結合エレメント（標的設定ペプチド）を含むTAGD粒子の表面の図解略図を示す。図2はリガンドをウイルス粒子に取り込むことのできる2種の異なった方法を示す。

【0026】

更なる実施例において、ベクターは、ベクターが新規に準備される表面の中に組換えコアを含むように配設される。この実施例は、粒子が現存の膜を含むかどうかに関らずウイルスコア粒子との使用に適している。かくして例えば、外膜層を欠く組換えウイルス粒子は人工生成脂質膜内に入ることができる。外膜を含む組換えウイルス粒子は（i）化学的方法により、（ii）新しい膜内での被包により、また（iii）現存する膜を新規に合成された新しい表面エレメントを含むように置換により修飾することができる。かくして生成する粒子の表面は前に述べたように免疫防御因子、融合誘導因子、および細胞特異性向上因子を含むように遺伝子操作することができる。加えて膜は宿主の血液循環でベクターの安定性を高める成分を含むことができ、これによりベクターが意図された標的に到達する機会を改善し、またベクターの作用の継続を増大する機会を提供する。

【0027】

ウイルスコア

ベクターのウイルスコア成分は遺伝子治療での使用に適したいずれかのウイルスコアである。広くさまざまな適切なウイルスコアが従来技術で公知の方法で調製することができ、またTAGDベクターの内部成分として使用することができる。遺伝子治療で利用されるウイルスの例としては、ジェーン、「遺伝子治療

のテキストブック」第4章、35-66ページ（ホグレフ・アンド・ヒューバー、1998年）を参照されたい。適切なウイルスコアは組換えウイルス、例えばHIVなどの複製欠損レンチウイルス、または他のレトロウイルス、例えばモロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）もしくはフレンドMLVなどの Maus 白血病ウイルス（MLV）、アデノウイルス、アデノ関連性ウイルス（AAV）、単純疱疹タイプ1（HSV-1）、ワクシニアウイルス、エプスタインバーウイルス、狂犬病および仮性狂犬病ウイルス、シンドビスウイルス、SV40、およびサイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、バキュロウイルス、セムリキフォレストウイルス（SFV）、および小疱性口内炎ウイルス（VSV）などを含む。これらのウイルスは、もし必要とあれば機能env遺伝子を欠くように遺伝子操作される。組換え方法によるenv遺伝子の除去はウイルスの免疫原性を減少させ、また更に細胞培養でビリオンの産生水準を増加させる。env遺伝子が除去されているウイルスは標的細胞に結合しまた融合する天然の能力を欠いている。従って、これらの能力はTAGDベクターで提供されねばならない。

【0028】

遺伝子治療での使用、および安全性を高めた天然ウイルスゲノムの進行性のより大きなセグメントを除去または置換するのに適した外因性遺伝子を含むこれらウイルスコアそれぞれを遺伝子操作する方法は、従来の技術で公知である。例えば、ジェーン、前掲同書；アンダーソン、ネイチャー、392巻（6679補遺）、25-30ページ（1998年）；ヴァーマ他、ネイチャー、389巻、239-242ページ（1997年）；WO 91/19798；WO 97/12622；WO 98/12314；および合衆国特許番号5,665,577号ならびに同5,686,279号を参照されたい。また更に、全般的にフィールズ他、「ウイルス学」リッピンコッターレーブン、1996年）を参照されたい。

【0029】

ここで記載された方法と組成物が、更に将来開発されるウイルスコア類似体（核酸）コアとの使用に適していることを当業者は認識するであろう。

【0030】

免疫防御エレメント

本発明の前後関係において、免疫防御エレメントはベクターの表面に配設されそれによりベクターの免疫原性を減少させる分子または分子の集合である。すなわちベクターが患者に投与される時、このエレメントは患者の血清の成分とベクターとの相互作用を減少させ、従って、免疫系の活性化を回避し、患者内のベクターの生体内のクリアランス率を低下させる。

【0031】

免疫防御戦略の例は薬剤送達粒子およびまたはその分子塊の電荷を減少させ、グリコシル化による粒子の親水性を減少させることを含む。もっとも広く使用されるアプローチは、血漿内でのオプソニンにより粒子の認識を減少させる粒子表面に「免疫デコイ」（免疫おとり）エレメントを付着させ、これにより免疫系の活性化を遅らせまたは完全に避ける方法である。デコイポリマーを薬剤送達ベクターに付着させる一つの方法はポリマーの脂質への接合を経るものである。この目的にもっとも普通に使用されるポリマーはポリ（エチレングリコール）（PEG）である（パパハドジョプーロス他、全米科学アカデミー紀要、15巻；11460-11464ページ（1991年））。同じ目的に使用されるエレメントは、シアル酸GM1ポリグリセロール（シャウアー、TIBS、1985年9月号；357ページ、山之内他、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース、113巻：141ページ（1995年）；ポリオキサゾリン-DSP（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン）誘導体（ザリプスキー他、ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス、85巻：133-137ページ（1996年））；ポリマーベイス「ステルス」アプローチ（トーチリン他、ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス、84巻：1049ページ（1995年））；ホスファチジルポリグリセロール（丸山他、バイオシム・バイオフィス・アクタ、1234巻：74-80ページ（1995年））；フレキシマー・ポリマーズ（（パピソフ、アドバンスド・ドラッグ・デリバリー・レビュー、32巻119-138ページ（1998年））；トーチリン、ジャーナル・オブ・マイクロエンキャプシュレーション、15巻、1-19ページ（1

998年))である。代替的免疫防御エレメントは、必ずしもそれに限定されないが、ポリグルタミン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリビニルピロリドン、ポリメタクルアミド、ポリエチルオキサゾリン、ポリメチルオキサゾリン、およびポリビニルアルコールを含む。PEGで前に記載したように、これら親水性ポリマーのそれぞれは、もし必要とあれば反応性化学基を通じてベクターと共有結合で結合され得る。本発明は更に粒子の表面に望ましい機能を導入した免疫防御機能を持つために使用できるグルタミン酸とロイシンのコポリマーに基づく新規な組合せリンカーを提供する。本技術分野の経験ある当業者は、グルタミン酸が含むことを認識するであろう。これら成分は機能的特性を分かち合う他の成分で置換することができる。これら成分は機能的特性を分かち合う他の成分で置換することができる。従って、グルタミン酸は、例えばアスパラギン酸と置換することができ、またロイシンには、例えばアラニン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリンおよび他の疎水性アミノ酸により置換することができる。天然または非天然アミノ酸が使用される。一つの選択肢として、疎水性機能はエステルまたはグルタミン酸のアミド誘導体として導入することができる。注目すべきは、ランダムコポリマーおよびまたはブロックコポリマーが類似の目的に使用される。

【0032】

PEGが免疫防御エレメントとして使用される時には、PEGは望ましくは約1000乃至約5000ダルトンの分子量を持つ。有利なことに、約2000ダルトンの分子量を持つPEGは免疫防御を達成するために使用される。膜含有薬剤送達ベクターの表面に反応性機能基を持つPEG鎖を配置するために、PEGはデステロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)などのリン脂質に接合される。他の脂質の使用も本発明の範囲内にあることを当業者は熟知しているであろう。更なる修飾可能PEGを含む適切なDSPE-PEG分子は従来の技術で公知であり、例えばシアウォーター・ポリマーズ(ハンツビル、アラバマ)から購入することができる。

【0033】

免疫防御エレメントの遺伝子送達ベクター、例えば膜で囲まれたウイルスコア

の表面への取り込みはミセル形成を経由して行うことができる。例えばアスター他、F e b s L e t t . 386巻：243ページ（1996年）を参照されたい。D S P E - P E G の分子は親水性であり、熱力学的に不安定でビリオンのより大きな膜表面と融合するミセルを自発的に形成する。このようなやり方での成功する挿入は以下に説明される方法を用いて実証することができる。粒子の血液クリアランス率での免疫防御エレメントの取り込み効果はアイソトープ標識粒子を用いてモニターすることができる。

【0034】

標的設定遺伝子送達に対しては、多価および多機能リンカーが多くの利点を提供する。本発明は以下で説明するように、グルタミン酸とロイシンなどのような酸性および疎水性アミノ酸の活性化コポリマーに基づく新規な多価および多機能リンカーを提供する。このようなリンカーの活性化は第三アミンの存在下でポリマーをジペンタフルオロフェニルカーボネートと反応させることにより実行することができる。当業者はN, N-ジシクロヘキシルカルボジイミドヒドロキシスクセネミド、B O P 試薬などの他の代替的な活性化手段の使用を熟知しており、またペプチド化学で周知の他の濃縮試薬は本発明の範囲内にある。望ましい機能グループ、例えばP E G または標的設定あるいは融合誘導ペプチドは次いで活性化リンカーと接合させる。このリンカーはウイルス膜により親和性である疎水性遺伝子座を所有し、また更に細胞表面により親和性である正の電荷を保持する活性基のある部分はリンカーの担体への共有結合付着のために保持（または新規に創出）することができる。このリンカーは壊れやすいウイルスを過剰な化学処理にさらすことなく多くの方法でウイルス表面を修飾するために使用される。

【0035】

標的設定エレメント

標的設定エレメントはベクターの標的細胞への高度に特異的な付着を強力にする。例えば標的設定エレメントは標的細胞の表面でレセプターまたはリガンドに結合する結合領域を含む標的設定ポリペプチドである。標的設定エレメントは、抗体またはその断片、レセプターリガンド、完全タンパク質、ペプチド、レセプター、リガンドとして役立つ非ペプチド有機分子、ビタミン、および細胞表面タ

ンパク質の無機補助因子より成るグループから選択される。有利なことに、標的設定エレメントは遺伝子治療、例えば癌細胞を標的とする望ましい宿主細胞により高度に発現されるレセプターに結合する。

【0036】

適切なリガンドは必ずしもそれに限定されないが、内皮細胞を標的設定する血管内皮細胞成長因子、血管を標的設定する FGF 2、またインテグリン発現細胞を標的設定するラミニンおよび RGD ペプチドを含む。他の実施例は (i) 組成物が細胞表面葉酸レセプターを持つ種瘍細胞を処置するよう意図された葉酸、(i i) 組成物がウイルス感染 CD 4⁺ リンパ球を処置するよう意図されたピリドキシル、または (i i i) 組成物が炎症の領域を処置するよう意図されたシアリル^{ox} ルーイス^{ox} を含む。望ましい実施例では、標的設定成分はペプチド擬態のものである。例えばキーバーエモンズ他、バイオテクノロジーにおける現在の考え方、8 巻、435-441 ページ；ホーブナー他、Angew. Chim. Int. Ed. Engl 36 巻、1374-1389 ページ（1997 年）；ポーレッティ他、アドバンスド・ドラッグ・デリバリー・レビュー、27 巻、235-256 ページ（1997 年）；ボクスス他、バイオオルガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー、6 巻、1577-1595（1998 年）；シェップファア、Bioorg. Med. 8 巻、2865-2870 ページ（1998 年））を参照されたい。

【0037】

望ましい実施例において、ペプチド擬態物は癌細胞のレセプターまたは他の標的に指向される。例えば α -メラノスタチンのペプチド擬態類似体（[N1e4, D-Phe7]- α -MSH）は黒色腫の処置に使用することができ、ここで黒色腫細胞は α -MSH レセプターを過剰発現する。他の癌関連ペプチド擬態物は従来^{ox}の知識で公知であり、本発明の範囲内にある。例えばキーバーエモンズ他、1997 年、前掲同書、ホーブナー他、前掲同書を参照されたい。ニューロテンシン、およびプラスミノゲン活性化剤のレセプター結合部位もまた癌関連リガンドとして記載されている（シュニール、およびグローナー遺伝子治療、3 巻：1069-73 ページ（1996 年））。他の標的設定リガンドは合衆国特許番号第 5,916,803 号に記載されており、その全体を引用例としてこ

こに取り込まれている。

【0038】

本発明のも一つの実施例において、適切なペプチドリガンドは、従来の技術で公知のファージディスプレイ法を用いて選択することができる。適当な方法は例えば合衆国特許番号第5,780,221号に記載されており、これはここでその全体を引用例として取り込まれている。要約すると、ランダム配列であらかじめ選択された長さのペプチドをコーディングする短い核酸配列のライブラリーが線維状ファージの表面タンパク質をコーディングする遺伝子に構造的に融合し、生成するペプチドはファージの表面で発現（表示）される。ファージは次いで適当な条件下で固定支持体に固定された細胞表面レセプターなどの標的分子との結合能力をスクリーンされる。数多くのペプチド配列の結合性能を同時にスクリーニングできるように、大きなライブラリーのファージを使用することができる。望ましい結合性能を持つファージは分離され、対応するペプチドリガンドをコーディングする核酸の配列が決定される。これらのペプチドは本発明の方法で直接リガンドとして使用でき、あるいは標的エレメントとして使用されるペプチド擬態物の設計と合成のための鋳型として使用することができる。

【0039】

TAGDベクター表面に存在する標的設定成分の数は、リガンドーレセプター相互作用の親和力、標的細胞表面のレセプターの相対的発生量、標的細胞の相対的発生量などの要素に依存して変化するにも拘らず、細胞標的設定で適切な向上を図るために、少なくとも20-100個の標的設定分子が各ベクターの表面に存在しなければならないであろうことが予想される。標的設定成分は各種の方法、例えば以下でより詳細に説明されるように熱力学的に不安定なミセル中間体を經由する方法を用いてTAGDベクター表面に取り込まれる。選択肢として、標的設定成分はベクター表面へのPEGの追加で前に記載の同じやり方でポリリンカーを用いて加えることができる。一つの実施例では、標的設定成分は標準リンカー化学で表面に結合することができる。例えば、ハーマンソン、バイオコンジュゲート技術（ピアス・ケミカル・カンパニー／アカデミックプレス、サンディエゴ、785ページ（1996年））を参照されたい。

【0040】

例えば脂質接合ポリマーを含む表面に対して、標的設定成分は「供与体-受容体」型の反応を経由して脂質-ポリマー接合体に化学的に連結することができる。かくして一つの実施例では、標的設定成分は脂質接合ポリマーに存在するマレイミド基（受容体）と反応できる遊離スルフヒドリル基（供与体）を運ぶように設計することができる。この反応の進捗状態はエルマン試薬の使用で測定されるマレイミド発色団の損失、および遊離スルフヒドリルの損失に起因する300nmでのUV吸収の減少を観察することによりモニターすることができる。従来の技術で公知の結合方法も使用することができ、例えば求核アミン基（供与体）との結合がそれである。当業者は更に、供与体成分が粒子表面に存在し、受容体が標的成分に存在し、あるいは必要とあればその逆も真であることを理解するであろう。同様に標的設定成分もまたTAGDベクターの脂質膜に、ベクターの脂質-ポリマー接合体成分にあるいはベクターに存在するいずれか他の適切な配設された表面成分に直接結合することとができる。

【0041】

このように一度接合されると、標的設定成分がその意図された標的に結合する能力を保持することを確実にすることが望ましい。コレステロールは従来の技術で公知である方法を使用することで行うことができる。例えば非接合標的設定成分の同系レセプターに結合する能力は結合成分の結合能力と比較することができる。この比較はアセンブルされたTAGDベクターを用いて行うことができるが、より便利にはTAGDベクターへの取り込み前に結合成分と非結合成分を比較することで達成させる。標的設定成分がアセンブルあるいは部分的にアセンブルされたベクターの成分に直接結合される場合には、この比較は標的設定成分がベクター成分と結合され生成するモデル化合物が次いで非接合標的設定成分と比較されるようなモデル反応を実施することにより達成され得る。

【0042】

接合標的設定成分がその標的と結合する能力を保持することを立証する間接接合検定の一つの例はメラノスタチン（ α -MSH）化合物を考察することで提供される。かくして α -MSHはスルフヒドリル基（SH）を含むPEGのDSP

E接合体と接合できるマレイミド機能で合成することができる。 α -MSH, DSPe-PEG-SH, およびDSPe-PEG- α -MSH接合体は黒色腫B16細胞内でメラニン形成を誘導するそれぞれの能力を同じナノモル濃度で比較することができる。接合ポリペプチド非接合 α -MSHペプチドが非接合 α -MSHペプチドと類似の活性を持つことが発見される。

【0043】

前に記載のように、接合体のTAGDベクターへの取り込みはより大きな膜表面と融合するミセルの能力を使用して達成することができる。適切な方法はカーポチン他(FEBS Lett-388巻; 115-118ページ(1996年¹²⁵))に記載される。アスター前掲同書も参照されたい。例えば脂質PEG-I α -MSH接合体はMoMuLVウイルス粒子と一緒に保温される。生成ビリオンはスクロース勾配でまず精製され、ついで不連続勾配遠心分離が行われる。高いアイソトープ計数がビリオンを含む分画と関連して発見される。も一つの実施例では、レッド蛍光DSPe-PET-ローダミン成分が同じ型のミセルを使用してビリオンに取り込まれる。MoMuLVはDSPe-PEG-ローダミンと共に保温され、次いでマウスはヒト細胞との結合を許される。細胞は次いで抗MoMuLV env抗体と共に保温され、次いでFITC標識二次抗体(グリーン蛍光)の追加が行われる。生成細胞はFACSで分析される。ここでただトレーサーとして使用されローダミン信号標識がウイルスレセプターを含むマウス細胞で特異的に検出され、またマウスウイルスと結合するレセプターを欠いているヒト細胞では非特異的信号標識が検出されなかったことが発見される。

【0044】

標的設定成分のTAGDベクターへの取り込みがベクターの細胞結合特異性を再び指向できることを示すために、DSPe-PEG- α -MSH接合体は前に記載の通りMoMuLVウイルス粒子で保温され、D10ヒト黒色腫細胞と結合する能力を検定することができる。修飾および非修飾MoMuLV粒子はD10細胞と結合され、それは次いで前に記載の方法を用いてモロニーenv特異的FITC信号標識の存在を検証される。MoMuLVはそれ自身ヒト細胞とは結合できないマウスウイルスであるが、一度脂質-PEG- α -MSH接合体で前処

理されると、ヒトD10細胞と結合することが発見される。しかしその表面にD S P E - P E G - α - M S Hを含まないM o M u L Vを用いた場合には結合は一切検出されなかった。これらの結果は、適切な結合成分を用いることでT A G D粒子の結合特性を再指向することが可能であることを示している。当業者はこの実施例が単に例証するものであり、この結果を一般に適用できるものとして更に十分に理解するであろう。

【0045】

細胞侵入エレメント

細胞侵入エレメントはT A G Dベクターと標的細胞の間の融合のために膜活性成分を提供することによりT A G Dベクターの宿主または標的細胞への侵入を助ける。標的薬剤送達での効率での主要な制約は標的細胞の膜を通過することであるため、機能的細胞侵入エレメントを持つT A G Dベクターは標的細胞に侵入することが可能であり改良された効率で治療化合物を送達することができる。

【0046】

有利な点は、細胞侵入エレメントペプチドなどの融合誘導成分、すなわち膜不安定化能力を持つペプチドである。融合誘導ペプチドは膜リン脂質の秩序だったパッキングを破壊することにより細胞膜に孔の形成を誘導する。ある融合誘導ペプチドは脂質の無秩序を促進し、このように各種性質の2個の膜エンベロープ粒子（例えば細胞、被包ウイルス、リボソーム）の近位に配置された膜の合体または融合の機会を高めるように作用する。他の融合誘導ペプチドは同時に2個の膜に付着し、膜の合体の原因となりその1個になる融合を促進する。融合誘導ペプチドの例はウイルスエンベロープタンパク質エクトドメインからの融合ペプチド、細胞質尾部からのウイルスエンベロープタンパク質膜近位ドメインの膜不安定化ペプチドを含む。

【0047】

他の融合誘導ペプチドはしばしば更に両親媒性領域を含む。両親媒性領域含有ペプチドの例は、メリチン、マゲイニン、H I V 1 g p 4 1細胞質尾部、微生物およびレプチリアン細胞毒ペプチド、例えばボモリチン1、パルダキシン、マストパン、クラブロリン、セクロピン、エントアメーバ属およびブドウ球菌

の毒素；（１）ウイルスエンベロープタンパク質の膜貫通（TM）ドメインのN末端領域、例えばHIV-1，SIV，インフルエンザ、ポリオ、ライノウイルス、およびコクサッキーウイルス；（２）TMEクトドメインに対する内部の領域、例えばセムリキフォレストウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、風疹ウイルス、および精子タンパク質PH-30からの融合ペプチド、（３）ウイルスエンベロープタンパク質の細胞質側に膜近位の領域、例えば鳥類白血症ウイルス（ALV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMuLV）、および脾臓壊死ウイルス（SNV）などからのウイルス融合ペプチドを含む。

【0048】

一般にこのような融合誘導ペプチドは膜などのような疎水性表面の存在下では両親媒性 α らせん構造を形成する傾向を持つ。両親媒性ペプチドは一方の側が疎水性であり他方の側が親水性であることを当業者は理解するであろう。一つの見地において、融合誘導ペプチド配列はエンベロープタンパク質の膜貫通部分の膜広がりセグメントが5'であるウイルスエンベロープタンパク質の部分から取られる。

【0049】

天然ウイルスにおいては、対象となる主題の両親媒性断片は、長さがしばしば約20アミノ酸であるエンベロープタンパク質の膜貫通部分の膜広がりセグメントの疎水性領域の位置を占める。一般に本発明の融合誘導ペプチドは、各種の長さのものであることができる。一つの実施例において、ペプチドは約12乃至約35アミノ酸残基を持つ両親媒性アミノ酸配列を含む。疎水性膜広がりセグメントはしばしばその細胞質末端近くに一般に屈曲構造と関連するグリシンまたはプロリンを含む。このような膜近似セグメントの両親媒性はその疎水性モーメントを計算することにより同定される。このような膜近位両親媒性セグメントの例が示される。

【0050】

も一つの実施例において、融合誘導ペプチドは前に記載のアミノ酸配列の誘導体または類似体であるアミノ酸配列を含む。誘導体または類似体は前に記載のア

ミノ酸配列のアミノ酸残基の少なくとも1個が置換されている。一つの実施例では、融合誘導ペプチドは前に記載の円エンベロープタンパク質の細胞質部分から誘導されたアミノ酸配列より成り、更に膜貫通タンパク質の少なくとも部分を含んでいる。

【0051】

ウイルスから誘導される融合誘導ペプチドの代表的な例は下記の表1で与えられる。表1では、負の数字はウイルスエンベロープタンパク質の予想される膜貫通領域のC末端領域にあるアミノ酸残基を引用し、また正の数字はペプチドにあるウイルスエンベロープのN末端で始まる細胞質尾部からの残基数を引用する。貫通膜と細胞質ドメインの間の境界は、約20疎水性アミノ酸N末端からウイルスエンベロープタンパク質のエクトドメインまでの広がりの中の最初の疎水性アミノ酸にある。かくして例えば、「-2/14」で示されたペプチドは、分離ペプチドが（N末端からC末端方向で）N末端の最初の2個のアミノ酸残基として、予想される膜貫通部分の2個のC末端アミノ酸を含み、また最後の14アミノ酸残基が予想される細胞質尾部の14N末端アミノ酸である、ということを意味している。表1は数多くのウイルスエンベロープタンパク質のもっとも親水性である膜近似セグメントの位置をリストする。

【0052】

【表1】

ウイルス	セグメント	ウイルス	セグメント
ALV	-2/14	INFA1	-2/11
BLV	-2/17	MoMuLV	-3/14
ELA	1/52	MMTV	-6/13
FIV	-6/10	MPMV	1/22
HEP C	1/17	RSV	-9/8
HIV 1	-3/11	PINF	1/17
HIV 25YR	1/25	SIV239	-5/13
HTLV2	1/12	SNV	-2/16
HRSV	1/21	VSV	-2/13
infM2	1/16	SimSrcV-HLB	-9/8

【0053】

更に表1では、下記の略語が使用されている：ALVー鳥類白血病ウイルス；BLVーウシ白血病ウイルス；EIAウマ伝染性貧血；FIVーネコ免疫不全ウイルス；HEP CーC型肝炎；HIVーヒト免疫不全ウイルス；HTLVーヒトT細胞白血病ウイルス；hRSVーヒトRSウイルス（ヒト呼吸器合胞体ウイルス）；infM2ーインフルエンザM2ウイルス；INFーインフルエンザ；MMTVーマウス乳腺癌ウイルス；MPMVーマソンーファイザーサルウイルス；RSVーラウス肉腫ウイルス；PINFーパラインフルエンザ；SNVー脾臓壊死ウイルス；VSVー水泡性口内ウイルス；SimSrcV-HLBーシミアン肉腫ウイルス；MoMuLVーモロニーマウス白血病ウイルス。

【0054】

望ましい実施例において、融合誘導体ペプチドは、MoMuLVエンベロープタンパク質（env）の膜近位細胞質ドメインである。このドメインは各種のウイルスの間で保存された構造的特性を持ち、また膜誘導 α らせんを含む。このペプチドは出願中の合衆国特許出願連続番号第09/112,544号に記載されており、その全体を引用例としてここに取り込まれている。

【0055】

も一つの実施例では、グルタミン酸とロイシンのコポリマーが融合誘導エレメントとして利用できる。これらのコポリマーは各種の物質を細胞に送達できる協力的な配座pH依存親水性／疎水性担体である。その全体を引用例としてここに取り込まれているWO 67/40854を参照されたい。しかしここで示されたこれらのコポリマーの膜浸透および膜混乱性質は、本発明の前後関係で異なる目的のために使用される。物質を細胞に送達するよりも、このコポリマーは遺伝子送達粒子表面の表面に付着されて、pH依存性融合誘導因子として、およびまたは他の望ましい機能（融合誘導、免疫防御、標的設定などの機能等）のための多価および多機能担体として作用する。グルタミン酸とロイシンまたは他の疎水性（天然または非天然のもの）アミノ酸とのコポリマーに基づいて、pH依存性リンカーの融合誘導性質は更に前に記載の融合誘導ペプチドの使用により増大することができる。

【0056】

ベクターの試験管内アセンブリ

TAGDのベクターをアセンブルするための一つの方法はベクターに加えるべきエレメントを含むミセル調製物の使用を通じて行われる。かくして例えば、標的設定リガンドと融合誘導エレメントは前記のとおり結合ポリマー-脂質化合物に共有結合することができ、生成接合分子は次いでミセルを調製するために使用される。これらのミセルはコア成分の調製物に加えられ、これにより接合体はコア成分の表面に挿入される。「拡散交換」という類似の方法が、例えば合衆国特許番号第5,631,018号に記載されており、その全体を引用例としてここに組み込まれている。

【0057】

TAGDをアセンブリする工程で使用される他の方法は従来で公知である。例えば、天然発生ウイルスエンベロープを修飾する一つの方法は、二重洗剤透析によるものであり、これは合衆国特許番号第5,766,625号に記載され、その内容はその全体を引用例としてここに組み込まれている。ウイルスエンベロープの脂質は、脂質およびまたは免疫防御ポリマーならびに洗剤、例えば部分的にエンベロープを可溶化するコール酸塩などの調製物を使用することにより

修飾される。洗剤は次いで食塩加リン酸緩衝液（PBS）に対して包括的透析により除去され、次いでデオキシコール酸ナトリウムまたは他の適切な洗剤での部分ミセル化による融合誘導成分およびまたは標的設定成分の挿入が行なわれる。洗剤は次いで再び包括的透析で除去される。

【0058】

「ミセル化」という用語は、追加の免疫防御脂質またはポリマー成分の取り見を可能にするよう「軟化」されるが、二層構造が喪失する点まで可溶化（ミセル化）されないウイルス膜を引用する。部分ミセル化のプロセスはレーザー光線拡散装置を用いて小胞の光の拡散をモニターして制御することができる。光線拡散信号を維持するために、十分な洗剤が小胞分散に導入される。光線拡散信号の損失は真の可溶化と二重構造の損失を示している。部分ミセル化の後、一つの実施例でのTAGD粒子の全体性がウイルス力価を測定することにより立証することができる。

【0059】

有用な洗剤は従来の技術に習熟した人にとって公知であり、必ずしもそれに限定されないが、胆汁酸塩（コール酸ナトリウム、デオキシコール酸、タウロコール酸など）、チャプス、オクチルグルコシド、トリトン-X誘導体（トリトン系界面活性剤）などを含む。これらの洗剤はチャプスなどのような両性イオン系か、またはオクチルグルコシドあるいはトリトン-Xなどのような非イオン系にすることができる。非イオン系洗剤は、それらがTAGD粒子での完全性の損傷を来すことが少ないので望ましい。洗剤の選択は特定の洗剤と挿入される表面タンパク質との適合性を考慮して決定される。

【0060】

一つの実施例でのTAGDベクターをアセンブルするも一つの方法は、1個またはそれ以上の免疫防御、標的設定および細胞侵入エレメントをウイルス粒子の表面に存在するウイルスタンパク質に共有結合させることである。かくして例えば、追加されるエレメントは活性化カルボキシル基を運ぶように準備でき、それが次いでウイルスタンパク質にある表面リシン分子の側鎖の遊離アミノ基と反応する。分子をタンパク質と結合する他の方法は従来の技術で公知である。例えば

表面リシン分子の側鎖は、遊離スルフヒドリル基を提供するために2-イミノチオレイン（トラウト試薬）と反応できる。これらの基は次いでマレイミド基を運ぶ免疫防御、標的設定および細胞侵入エレメントと反応できる。

【0061】

新規な機能エレメントを含有する表面でTAGDベクターを調製する方法は、追加脂質の存在下でエンベロープウイルスを超音波処理または渦巻き運動させることを含み、これによりこれらの追加の脂質は現存する脂質膜に導入される（例えばファン他、バイオケミストリー、8巻：344-352ページ（1969年）を参照されない）。望ましい新規な機能成分を含有するTAGDベクターはコア含有粒子の存在下でリポソームを形成することで調製される。これらの方法は、洗剤透析によるリポソーム形成：例えば香川他、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、246巻：5477-5488ページ（1971年）を参照されたい；凍結融解法（メーヤー他、バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ、817巻：193-196ページ（1985年）およびバリー他：薬剤担体としてのリポソーム、グリゴリアディス編，G. チェスター・ニューヨークブリスベン・トロント・シンガポール：ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、841-854ページ（1988年）所収参照）；逆相蒸発法（スゾカ他、バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ、601巻：559-571ページ（1980年）参照を含む。最後に、ロイシンとグルタミン酸のブロックコポリマーが脂質のように行動して膜を形成することが示された。箕浦、ラングミュア、14巻：2145-2147ページ（1998年）を参照されたい。従って、このようなブロックコポリマーは前に記載の方法を用いてTAGDベクターで膜エレメントとして使用することができる。

【0062】

TAGDコアがレトロウイルスベクターである時には、ここでその全体を引用例として取り込まれている合衆国特許第5,661,022号に記載された方法により大量に産出され精製される。

【0063】

ベクター投与の方法

TAGDベクターは従来公知の方法で投与される。望ましくはベクターは、非経口で、より望ましくは静脈内または動脈内で投与される。

【0064】

ベクターの試験管内検定

本発明のベクターの試験管内検査方法は従来の技術で公知である。例えばベクターは、標的細胞でのベクターの成功裡の挿入と発現を追跡するのに使用できるレポーター遺伝子または選択マーカを含む。例えばベクターは β ガラクトシダーゼ (β -gal)、クロムフェニルコールアシルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ (Luc)、またはグリーン蛍光タンパク質 (GFP) などのレポーター遺伝子を含むように遺伝子産物発現の水準が測定される。制御目的のために

この発現は、標的測定リガンドおよび細胞侵入エレメントの一方または両方、免疫防御エレメントを欠いているベクターで得られた発現と比較される。選択肢として、ベクターはネオマイシン耐性遺伝子などの耐性マーカを含むことができる。ベクターの標的細胞への適用に続き、細胞は薬剤耐性を検出される。

【0065】

ベクターの試験管内効率検定

本発明のベクターの試験管内効率を測定する方法は、従来の技術で公知である。たとえばベクターが哺乳類の免疫の処置に使用される時には、ベクターの効率は疾病の1個またはそれ以上の症状の回復によって決定することができる。有利なことに、生体内効率は疾病の経過または範囲の特徴である定められた臨床終点の測定を使用できる。遺伝子治療への候補疾病は従来の技術で公知である。例えば、バーマ他、ネイチャー、389巻、239ページ (1997年) およびそこで引用された文献を参照されたい。

【0066】

このようにして記載された本発明は下記の実施例を参照することにより容易に理解されるであろうし、それは概略で提供されており、また本発明を限定することを意図したものではない。

【0067】

実施例

下記の実験は、合成成分をコア含有粒子の表面に挿入できることを示す。特異的には、レトロウイルスベクターはその表面に α -MSHペプチド擬態リガンドを含ませるために非遺伝子手段により機能的に修飾された。このリガンドで標的化されるTAGDベクターは異色腫の遺伝子治療に有用である。加えて実験はレトロウイルス粒子の被包を記載する。

【0068】

これらのステップを実行するために3件のアプローチ、すなわち(1)直接粒子表面の修飾、(2)表面挿入のためのミセル中間体の使用、および(3)多機能で多価のリンカーの使用が行われる。これらの方法はリボソームリガンドと生体の表面への小さいペプチドの直接の化学的付着を準備するためにこれまでに使用された方法を利用する(カシュキン他、イムノロジージャ、N6、37-40ページ(1987年)と同著者の証明文言、USSR N 145085, A-61 K39/39(1988年)を参照のこと)。

【0069】

担体分子の標的設定リガンドへの接合

担体分子の接合時、マレイミドイル誘導体を標的設定リガンドに存在するチオール基に反応させて達成された。PEGは従来の技術で公知の方法を用いてホスファチジルエタノールアミンと接合され、標準方法を用いてマレイミド誘導体(マレイミド-PEG-PE)に転換された。生成化合物は標的リガンドペプチドとしてのCys598-616ペプチド(ILNRLVQFVKDRISVVQAL)に接合された。この接合は300nmで吸収するマレイミドイル基の性質を利用してモニターされた(ハーマンソン、前掲同書)。類似の結果は脂質(すなわちDSPE)-PEG-SHと、 α -MSHのマレイミド化類似体および他のペプチドとの接合で得られ、ここで他のペプチドは、MSHのペプチド擬態類似体([Nle4, D-Phe7]- α -MSH, サンディエゴ、カリフォルニア、ノババイオケムから得られたもの)である α -MSH^{NLD}を含む。

【0070】

接合体でのペプチドの転換の水準はマレイミドイル基のモル吸光度を基礎にし

て計算された ($630 \text{ M} / \text{cm}^{-1}$)。反応の完成はエルマン試薬を用いて未結合チオールを測定して決定された。接合体は更にそれ以上の実験の結果を妨げかねない未結合のペプチドを接合体が持たないことを確認するために、質量分析法 (ES/MS および MALDI-TOF) により特徴付けられた。準備された接合体はアプロティック接地でのゲル精製で、またミセル形態では透析により精製された。カーヌープ他、J. Peptide Res. 49巻: 232-239ページ (1997年) を参照されたい。

【0071】

生成された脂質-PEG- α -MSH接合体は、黒色腫B16細胞でのメラニン形成の検定により生物活性を保持することが示された。かくして α -MSH, DSPE-PEG-SH, およびDSPE-PEG- α -MSH接合体は同じナノモル濃度で検定された。 α -MSH接合体は非接合 α -MSHペプチドと比較できる効率でメラニン形成を誘導した。

【0072】

ウイルス粒子への接合体の取り込みと細胞標的設定

より大きな膜表面と融合する熱力学的に不安定なミセルの性能がTAGDベクターの構築での次のステップに利用された。この方法は脂質-ポリマー標的設定リガンド接合体のリポソーム (カーポティン、前掲参照) またはビリオン (下記参照) のいずれかの膜表面に取り込むために利用できる。

【0073】

脂質-PEG-¹²⁵I- α -MSH接合体はMoMuLVウイルス粒子と共に保温された。修飾されたビリオンはスクロース勾配のステップでまず精製され、次いで不連続勾配遠心分離が行われた。ビリオンがペレットにされた同じ分画と会合するために高いアイソトープ計数が示された。

【0074】

この方法の有用性を更に検証するためにDSPE-PEG-ローダミン (レッド蛍光) がミセルを利用してビリオンと会合された。かくしてMoMuLVは、DSPE-PEG-ローダミンで保温され、マウスNIH 3T3細胞またはヒトD10黒色腫細胞と結合できるようにされた。細胞は次いで抗MoMuLV

e n v抗体と共に保温され、次いでF I T C標識二次抗体（グリーン蛍光）と共に保温された。その結果（図3参照）は、ローダミン信号（図3の右上四分円部のレッド蛍光）がウイルス粒子がミセルとの保温で接合体を取り込められた時のみウイルスレセプターを含むマウス細胞で特異的に検出されたことを示している。かくしてD S P E - P E G - ローダミンは予期されたようにM o M u L V粒子に侵入し、マウス宿主細胞上で検出できる。

【0075】

次にD S P E - P E G - α - M S H^{MD} 接合体はM o M u L Vウイルス粒子と共に保温され、マウスレトロウイルス粒子がD 1 0ヒト黒色腫細胞と結合するように再指向する接合体の性能を示すために検定された。修飾および非修飾M o M u L V粒子はD 1 0細胞との結合を許され、これらの細胞は抗e n v一次n d F I T C標識二次抗体（前記のもの）で検出されるモロニーe n v特異的信号の存在を検出された。F A C Sプロファイルは脂質 - P E G - α - M S H接合体で前処理されたM o M u L Vの結合に続くヒトD 1 0細胞上の正の移動を示した。負の調節では、脂質 - P E Gで修飾されるが α - M S Hを欠いているビリオンはヒト細胞への類似の結合を示さなかった。これらの実験は、マウスレトロウイルス粒子が α - M S Hペプチド擬態接合体の表面取り込みによりヒト黒色腫細胞と結合するように修飾することを示している。従って表面修飾粒子を新しく特異的な宿主細胞に再指向できることが示された。

【0076】

同じ粒子はヒト細胞を形質導入する性能を試験された。D S P E - P E Gを通じて（e c o産生細胞系G P E 8 6 / L N C Xからの）組換えウイルス粒子の表面に結合される α - M S Hの接合体はウイルス力価 $> 10^2$ を提供し、それはマーカ遺伝子（n e oおよび β - g a l）の送達の意味していた。グルタミン酸とロイシンのコポリマーがM o M u L Vの表面で α - M S Hの表示として使用された時に $> 10^4$ の力価のものが得られた。マウスN I H 3 T 3細胞での非修飾および非遺伝子操作粒子の野生型M o M u L V力価はほぼ 10^6 位である。コポリマー - M S H接合体の調製の詳細は以下で述べられる。

【0077】

TAGDベクターを創り出すための代替的アプローチは、機能ペプチド、ペプチド擬態物およびポリマーを直接または新規な多機能および多価リンカーを通じてビリオンの表面に化学的に接合する方法を使用する。これらの化学的接合法は有機副次溶媒の使用と他の反応性有機化合物での処置を必要とし、かくしてまずウイルス生存能力を支持する化学的修飾試薬の作用濃度を確立する必要があった。ウイルスは各種の有機溶媒と接合体での処置を受けた。MoMuLVが有機溶媒での処置に驚くばかり安定しており、5%（量/量）までのアセトニトリルまたはDMFで30分処置した後でも殆ど完全な感染性を保持していたことが判明した。これらの結果は、ウイルスがビリオンの化学的修飾を実施するのに必要な条件に耐えることができるということを示している。

【0078】

MoMuLV感染性がトラウト試薬での修飾後も保持されることが示された。これは接合体をトラウト試薬でウイルス表面の修飾を通じてビリオンに共有結合で付着し、次いでマレイミドイル化合物で修飾ウイルスを反応させ得るということも示している。修飾の最適条件は1-8mMのトラウト試薬であることが発見された。

【0079】

90%のグルタミン酸塩（重量/重量）と10%のロイシンを含む多機能で多価のリンカーを用いて α -MSHペプチド擬態リガンドをMoMuLV表面に取り込むことが可能であることを更なる実験が示した。例えばバイコバ他、分子生物学（モスクワ）14巻、278-286ページ（1980年）を参照された。要約すると、ポリマー（100mg）が300mgのジイソプロピルエチルアミン（DIEA）が1mlのDMFに溶解され、ゆっくりと0.1mlの部分に加えられた。40分後、反応産物はエーテルで沈殿され、エーテルとペンタンで洗浄され、その後乾燥された。生成活性リンカー（10mg）は2mlのDMFに溶解された。ペプチド（ α -MSH^{NLD}、1mg）が加えられ、次いで35mlのDIEAが加えられた。反応物は室温で一晩振動され、次いで-20℃で貯蔵された。このようなやり方でリンカーの追加は、活性ペンタフルオロフェニルエステルが遺伝子送達ベクターの表面に更に接合を行うためにまだ残存し

ていることを保証した。

【0080】

このリンカー-MSH接合体は次いでD S P E-P E G-M S Hについて前に記載したものと同一条件下でウイルスベクターと共に保温された。修飾後に、M o M u L V粒子はウエスタンブロット分析を用いてウイルス粒子への α -M S Hの取り込みを検定された。 α -M S H正の信号は修飾ウイルスのe n vタンパク質と含有していることが発見されたが、非接合 α -M S Hが負の調節に加えられた非修飾ウイルスには存在しなかった。このようなやり方でのM S Hリガンドの追加は更に修飾M o M u L V粒子の結合特性をうまく再指向させた。かくして α -M S Hペプチド擬態リガンドを含む多機能多価リンカーを含む化学的修飾M o M u L Vはヒト黒色腫D 1 0細胞に結合できたが、一方、非修飾ウイルスは結合しなかった。前掲文献に記載された化学的修飾に比べると、多機能リンカーを用いた結合が優れていることが発見された。これらの結果は図4で示される。

【0081】

M o M u L V粒子の新規な機能表面への再被包

本実験はビリオンなどの遺伝子送達粒子が新しい機能表面で再被包され得ることを実証する。UV不活性化センダイウイルスがM o M u L V粒子の遺伝子容量を新規な宿主に送達するこのような機能再標的設定融合誘導エンベロップ表面を提供するために使用された。センダイウイルスはこれまでに裸の膜表面と融合することが実証され、遺伝子送達では融合誘導リボソームの成分として適用されてきた(中西他、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース、54巻; 61-68ページ(1998年)で検出された)。UV不活性化センダイウイルスはグリーン蛍光タンパク質(G F P)マーカー遺伝子をコード化するM o M u L Vと融合するために使用された。M o M u L Vがヒーラ細胞の培養物に加えられた時、G F P発現は検出されなかった。しかしM o M u L Vのセンダイウイルスとの融合はヒトヒーラ細胞でのG F P発現を可能にし(>50 c f u / m l)、マウスウイルスM o M u L Vによるヒト細胞系の形質導入を実証した。従ってこれらの結果は、融合および再標的設定分子を含む人工表面でコアが再エンベロップ化を達成できることを実証する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 免疫防御エレメント（PEG）、融合誘導エレメント（膜不安定化ペプチド）および細胞結合エレメント（標的設定ペプチド）を含むTAGD粒子表面を示す概略図

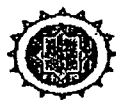
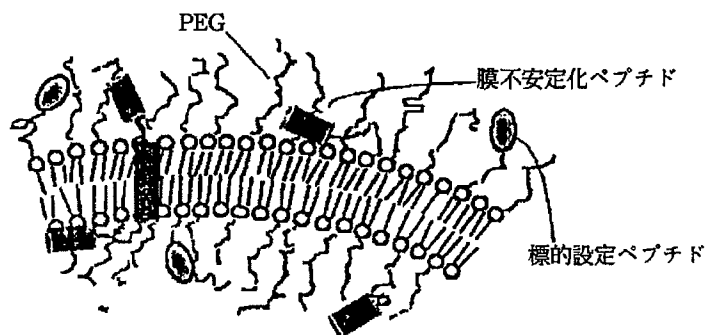
【図2】 リガンドを表面に取り込んで TAGD粒子を生成できる二つの異なる方法を示す図

【図3】 DSPE-PEG-ローダミンを含むミセルと共にビリオンを保温した後ウイルス粒子と会合するDSPE-PEG-ローダミン（レッド蛍光）を示す図

【図4】 α -MSHペプチド擬態リガンドを含む多機能多価リンカーを含む化学的修飾MoMuLVがヒト黒色腫D10細胞と結合でき、一方非修飾ウイルスは結合できなかったことを示す図

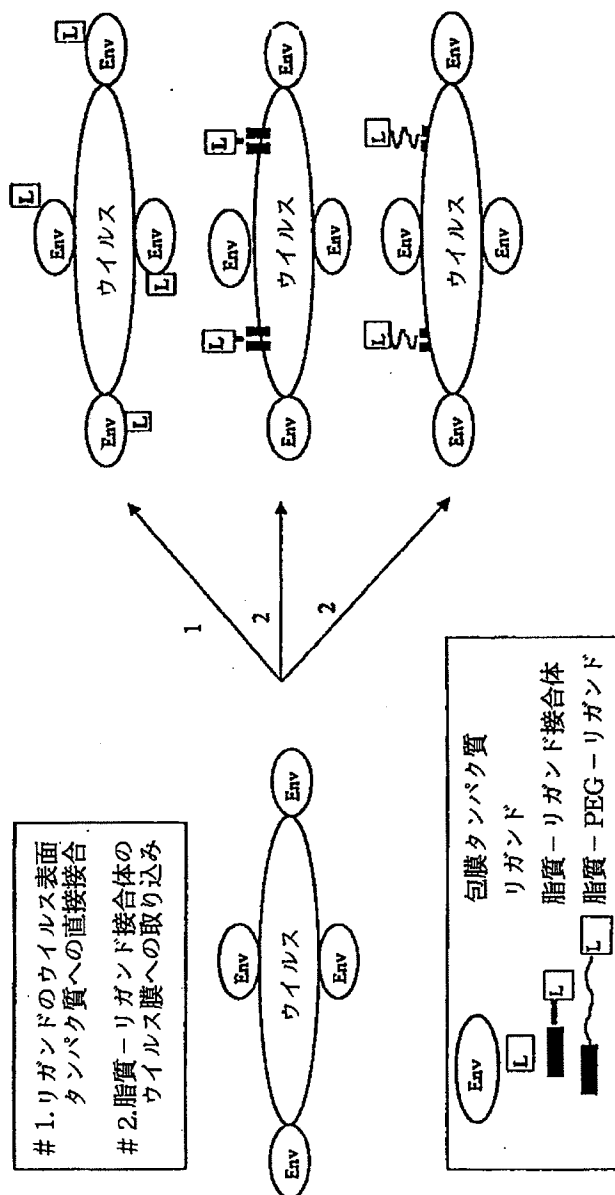
【図1】

標的人工遺伝子送達（TAGD）表面エンジニアリング

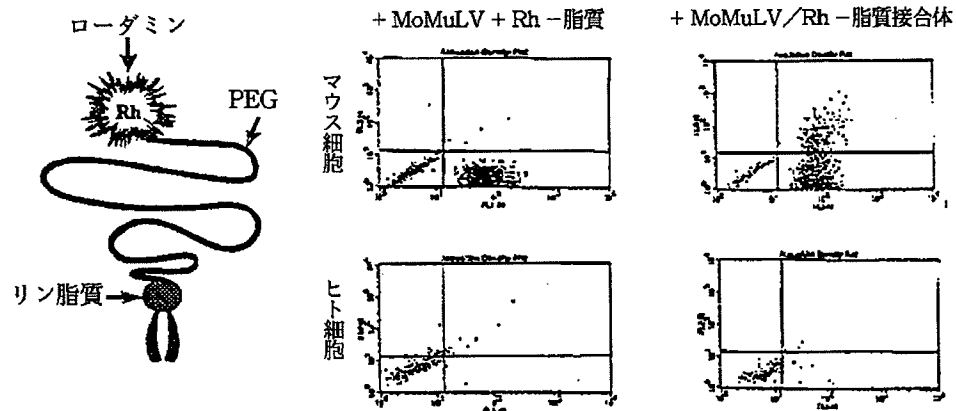


【図2】

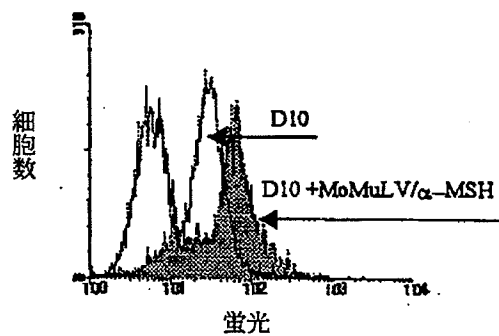
リガンドのウイルス表面への取り込み



【図3】



【図4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/US 00/22619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/87 C12N15/86 A61K47/48 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 21036 A (VIAGENE INC) 11 July 1996 (1996-07-11) the whole document, in particular page 5 line 28 to page 6 line 5, page 12 and page 27 line 30 to page 28 line 24 -/-	1-7, 9, 10, 16, 18, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 January 2001

Date of mailing of the international search report

06.02.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Julia, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. J. Appl. Application No
 PCT/US 00/22619

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	<p>FASBENDER A ET AL: "COMPLEXES OF ADENOVIRUS WITH POLYCATIONIC POLYMERS AND CATIONIC LIPIDS INCREASE THE EFFICIENCY OF GENE TRANSFER IN VITRO AND IN VIVO" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 10, 7 March 1997 (1997-03-07), pages 6479-6489, XP002060642 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document, in particular page 6488 left column</p>	1-3, 7, 18, 19, 21
X	<p>WO 98 44938 A (ANDERSON W FRENCH ; GORDON ERLINDA MARIA (US); HALL FREDERICK L (US) 15 October 1998 (1998-10-15) the whole document, in particular paragraph bridging pages 17 to 18 and figure 18</p>	1, 2, 4, 8, 9, 18, 19
A	<p>US 4 948 590 A (HAWROT EDWARD ET AL) 14 August 1990 (1990-08-14) the whole document, in particular column 6, lines 23-26 and column 18, lines 1-2</p>	1-3, 8, 18
A	<p>US 5 631 018 A (ZALIPSKY SAMUEL ET AL) 20 May 1997 (1997-05-20) cited in the application the whole document, in particular column 10 lines 20-32</p>	1, 3, 4, 7, 16, 18, 19, 21-23
A	<p>WO 97 40854 A (ANTIVIRALS INC) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole text, in particular pages 24-25, 27 and figures 3, 12</p>	1, 3-7, 10, 12, 17, 19-23
A	<p>JANUSZESKI M M ET AL: "Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 71, no. 5, May 1997 (1997-05), pages 3613-3619, XP002130560 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	5, 6, 10, 11, 13-15
P, X	<p>WO 00 02909 A (ANDERSON W FRENCH ; ROZENBERG YANINA (US); UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 20 January 2000 (2000-01-20) the whole document, in particular pages 19-27</p>	1, 2, 5, 10, 11, 13-15, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/22619**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/US 00/22619

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9621036 A	11-07-1996	AU 4690596 A	24-07-1996
WO 9844938 A	15-10-1998	AU 6890398 A EP 0973538 A	30-10-1998 26-01-2000
US 4948590 A	14-08-1990	NONE	
US 5631018 A	20-05-1997	US 5395619 A AT 162710 T AU 6357594 A CA 2156901 A DE 69408304 D DE 69408304 T DK 688207 T EP 0688207 A ES 2114186 T JP 3066437 B JP 8507523 T WO 9420073 A	07-03-1995 15-02-1998 26-09-1994 15-09-1994 05-03-1998 20-08-1998 06-04-1998 27-12-1995 16-05-1998 17-07-2000 13-08-1996 15-09-1994
WO 9740854 A	06-11-1997	AU 2929897 A EP 0966303 A JP 2000509394 T US 6030941 A	19-11-1997 29-12-1999 25-07-2000 29-02-2000
WO 0002909 A	20-01-2000	AU 4386999 A	01-02-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 K 47/46		A 6 1 K 47/46	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	メドベードキン, ビアチェスラブ アメリカ合衆国, 90004 カリフォルニア, ロスアンジェルス, アパートメント 110, バージル 160		
(72)発明者	アンダースン, ダブリュ., フレンチ アメリカ合衆国, 91108 カリフォルニア, サンマリノ, オクスフォード ロード 960		
Fターム(参考)	4B024 AA01 BA80 CA02 CA04 CA05 EA02 FA20 GA11 GA18 HA01 HA08 HA11 HA17 4C076 AA95 EE23 EE41 EE56 4C084 AA13 NA13 4C087 BC83 NA13		